

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-531146

(P2002-531146A)

(43)公表日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51)Int.Cl'	識別記号	F 1	マーク(参考)
C 12 N 15/09	ZNA	C 07 K 14/435	4 B 0 2 4
C 07 K 14/435		C 12 N 1/15	4 B 0 6 4
C 12 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5
—	1/21	C 12 P 21/02	C
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-586958(P2000-586958)  
 (86) (22)出願日 平成11年12月10日(1999.12.10)  
 (85)翻訳文提出日 平成13年6月8日(2001.6.8)  
 (86)国際出願番号 PCT/US99/29405  
 (87)国際公開番号 WO00/34526  
 (87)国際公開日 平成12年6月15日(2000.6.15)  
 (31)優先権主張番号 09/210,330  
 (32)優先日 平成10年12月11日(1998.12.11)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP

(71)出願人 クロンテック・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94303,  
 パロ・アルト, イースト・メドウ・ドライブ 1020  
 (72)発明者 ルキャム, セルゲイ アナトリエビッチ  
 ロシア国 モスクワ, ウーリツィアゴルビンスカヤ 13/1-161  
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Anthozoa由来の非生物発光性蛋白由來の蛍光タンパク質、そのようなタンパク質をコードする遺伝子、およびそれらの使用

## (57)【要約】

本発明は、Anthozoa由来の非生物発光性蛋白由來の新規な蛍光タンパク質（具体的には、amFP486, cFP484, zFP506, zFP538, dsFP483, drFP583, asFP600, dgFP512、およびdmFP592からなる群より選択される、単離および精製された蛍光タンパク質）に関する。その蛍光タンパク質をコードする核酸配列を同定する方法、さらにそのタンパク質を分析する方法が開示される。

( 2 )

特表2002-531146

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 天然の環境以外において存在する非生物発光性Anthozoa蛍光タンパク質。

【請求項 2】 *Anemonia majano*、*Clavularia* sp.、*Zoanthus* sp.、*Discosoma* sp.「red」、*Discosoma striata*、*Anemonia sulcata*、*Discosoma* sp.「magenta」、および*Discosoma* sp.「green」からなる群より選択される非生物発光性Anthozoa種によって產生される、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 3】 amFP486、cFP484、zFP506、zFP538、dsFP483、drFP583、asFP600、dgFP512、およびdmFP592からなる群より選択される、請求項2に記載のタンパク質。

【請求項 4】 配列番号55；配列番号56；配列番号57；配列番号58；配列番号59；配列番号60；配列番号61；配列番号62；および配列番号63からなる群より選択される配列を有する、請求項2に記載のタンパク質。

【請求項 5】 単離されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項 6】 天然の環境以外において存在する核酸であって、ここで該核酸は請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質、またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を有する、核酸。

【請求項 7】 請求項6に記載の核酸のフラグメント。

【請求項 8】 ベクターおよび請求項6または7に記載の核酸を含む、構築物。

【請求項 9】 請求項6または7に記載の核酸で形質転換した細胞、またはその後代。

【請求項 10】 請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質を產生する方法であって、該方法は以下の工程：

該タンパク質を產生するために請求項9に記載の細胞を増殖させる工程、を包含する、方法。

( 3 )

特表2002-531146

【請求項 11】 蛍光タンパク質をコードする核酸を利用する適用であって  
、ここで改善点として：  
請求項 6 または 7 に記載の核酸を利用する工程、  
を包含する、適用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の背景)

本発明は、分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、新規な蛍光タンパク質、そのタンパク質をコードするDNA配列を同定する方法、およびそれらの使用に関する。

## 【0002】

## (関連技術の説明)

蛍光標識は、目的のタンパク質、細胞、または生物を標識するため特に有用なツールである。伝統的に、目的のタンパク質は精製され、次いで蛍光団誘導体に共有結合的に結合体化される。インビオ研究のために、次いで、タンパク質-色素複合体が、マイクロビペッティングまたは可逆的透過化処理の方法を使用して、目的の細胞に挿入される。しかし、色素吸着工程および色素挿入工程は、プロセスを、骨が折れかつ制御することが困難にする。目的のタンパク質を標識する代替的な方法は、目的のタンパク質を発現する遺伝子を、マーカーを発現する遺伝子に連結または融合させ、次いで融合産物を発現することである。タンパク質標識のこの方法のための代表的なマーカーは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼである。しかし、これらのマーカーは、外因性の基質または補因子を必要とし、従ってインビオ研究のためには用途が限定される。

## 【0003】

外因性補因子または基質を必要としないマーカーは、クラゲであるAequorea victoriaのグリーン蛍光タンパク質(GFP)であり、このタンパク質は、395 nmに最大励起を有し、475 nmに第2の励起ピークおよび510 nmに最大発光を有する。GFPは、238アミノ酸タンパク質であり、アミノ酸65~67が発色団の形成に関与する。

## 【0004】

遺伝子発現およびタンパク質局在の研究のためのGFPの使用は、Chalfieら、Science 263 (1994)、802-805頁、およびHe

(5)

特表2002-531146

imら、Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (1994)、1250  
 1-12504によって詳細に議論される。さらに、Rizzutoら、Cur  
 r. Biology 5 (1995)、635-642は、細胞中で細胞内オル  
 ガネラを可視化するためのツールとしての野生型GFPの使用を議論するが、一  
 方KaetherおよびGerdes、Febs Letters 369 (1  
 995)、267-271は、野生型GFPを使用して、分泌経路に沿ったタン  
 パク質輸送の可視化を報告する。植物細胞におけるGFPの発現は、Huおよび  
 Cheng、Febs Letters 369 (1995)、331~334  
 によって議論されるが、一方Drosophila胚におけるGFP発現は、D  
 avisら、Dev. Biology 170 (1995)、726~729に  
 よって記載される。

#### 【0005】

野生型GFPおよび変異型GFP S65Tの結晶構造は、GFPの三次元構  
 造がバレルに類似することを示す (Ormoら、Science 273 (19  
 96) 1392~1395; Yangら、Nature Biotechnol  
 . 14 (1996)、1246-1251)。バレルは、コンパクトな構造中の  
 $\beta$ シートからなり、ここで、その中心において、発色団を含有する $\alpha$ ヘリックス  
 は、バレルによって遮蔽されている。コンパクトな構造は、GFPを、多様な条件  
 下および/または厳しい条件下（例えば、プロテアーゼ処理）で非常に安定に  
 して、一般に、GFPを極度に有用なレポーターにする。しかし、GFPの安定性は、短期間の事象または反復する事象を決定することについて、GFPを最適  
 より下にする。

#### 【0006】

多数の研究が行われており、種々の研究目的のために、GFPの特性を改善し  
 、そして、有用かつ最適化されたGFP試薬を生成する。GFPの新しいバージ  
 ョンが開発され（例えば、「ヒト化」されたGFP DNA）、そのタンパク質  
 産物が哺乳動物細胞中で合成を増大される (Haasら、Current Bi  
 ology 6 (1996) 315~324; Yangら、Nucleic Ac  
 cids Research 24 (1996) 4592~4593）。そのよ

うな1つのヒト化タンパク質は、「増強されたグリーン蛍光タンパク質（EGFP）」である。GFPへの他の変異は、ブルー光、シアン光、およびイエロー-グリーン光放射バージョンを生じた。GFPの大きな有用性に関わらず、GFPに類似しているかまたは異なる特性を有する他の蛍光タンパク質が、当該分野において有用である。新規な蛍光タンパク質は、可能な新規な色を生じるか、またはpH依存性の蛍光を生成する。より大きな励起についての新規なスペクトルおよびより良好な適合性に基づいて、新規な蛍光タンパク質の他の有用な利点には、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の可能性を含む。

#### 【0007】

先行技術は、そのDNAコード配列が公知である新規な蛍光タンパク質において不完全である。本発明は、当該分野におけるこの長年にわたる必要性を満足する。

#### 【0008】

##### （発明の要旨）

本発明は、amFP486、cFP484、zFP506、zFP538、dsFP483、drFP583、asFP600、dgFP512、およびdmFP592からなる群より選択される、単離および精製された蛍光タンパク質に関する。

#### 【0009】

本発明の1つの実施形態において、サンプル中の核酸配列の存在をスクリーニングする工程を包含する、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供され、ここで上記核酸配列は、配列番号3、5、8、11、12、および14からなる群より選択される配列を有するペプチドをコードする。上記核酸配列の存在は、上記蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

#### 【0010】

本発明の別の実施形態において、サンプル中の核酸配列の存在をスクリーニングする工程を包含する、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供され、ここで上記核酸配列は、配列番号4、6、7、9、10、13、15、および16からなる群より選択されるプライマーとハイブリダイズする。上

( 7 )

特表2002-531146

記核酸配列の存在は、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

#### 【0011】

本発明のさらに別の実施形態において、細胞中で蛍光タンパク質を分析する方法が提供され、上記方法は、上記細胞中で配列番号55～63からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する蛍光タンパク質をコードする核酸配列を発現する工程；および上記タンパク質からの蛍光シグナルを測定する工程を包含する。この方法はさらに、上記シグナルに従って上記細胞を分別する工程を包含する。好ましくは、上記細胞は、蛍光活性化細胞分別法によって分別される。なお好ましくは、上記核酸配列が、上記蛍光タンパク質に融合された目的のタンパク質をコードする目的の遺伝子を含み、ここで上記目的のタンパク質は上記蛍光タンパク質と異なる。検出された蛍光シグナルは、上記細胞中の上記目的の遺伝子の存在を、およびさらに、上記目的のタンパク質の存在を示す。上記蛍光タンパク質の細胞内局在を同定することによって、上記目的のタンパク質の細胞内局在もまた同定される。

#### 【0012】

本発明の他のおよびさらなる局面、特色、および利点は、開示の目的のために与えられる本発明の現在好ましい実施形態の以下の記載から明白である。

#### 【0013】

##### (発明の詳細な説明)

本明細書において用いる場合、用語「GFP」は、*Aequorea victoria*由来の塩基性のグリーン蛍光タンパク質をいう。これには、より大きい蛍光を提供するかまたは異なる色で蛍光発光するように操作されたGFPの先行技術のバージョンを含む。*Aequorea victoria*のGFPの配列（配列番号54）は、Presherrら、Gene 111 (1992)、229～33に開示されている。

#### 【0014】

本明細書において用いる場合、用語「EGFP」は、2つのアミノ酸置換を有するGFPの変異改変体をいう：F64LおよびS65T (Heimら、Nature 373 (1995), 663～664)。用語「ヒト化」は、ヒト細胞

におけるタンパク質の発現についてコドンを最適化するように GFP核酸配列に作製された変化をいう (Yangら、Nucleic Acids Research 24 (1996)、4592~4593)。

#### 【0015】

本発明に従って、従来の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術（当業者の範囲内）が使用され得る。このような技術は、文献中で十分に説明される。

例えば、Maniatis、FritschおよびSambrook、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual (1982)」；「DNA Cloning:A Practical Approach」第I巻およびII巻 (D. N. Glover編, 1985)；「Oligonucleotide Synthesis」 (M. J. Gait編, 1984)；「Nucleic Acid Hybridization」 (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1985))；「Transcription and Translation」 (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1984))；「Animal Cell Culture」 (R. I. Freshney編 (1986))；「Immobilized Cells and Enzymes」 (IRL Press, (1986))；B. Perbal、「A Practical Guide To Molecular Cloning」 (1984) を参照のこと。

#### 【0016】

「ベクター」は、プラスミド、ファージまたはコスミドのようなレプリコンである。ここでは、付着したセグメントの複製をもたらすように、別のDNAセグメントが付着され得る。

#### 【0017】

「DNA分子」は、一本鎖形態または二本鎖ヘリックスのいずれかでの、デオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミンまたはシトシン）のポリマー形成をいう。この用語は、この分子の一次構造および二次構造のみをいい、そして任意の特定の3次形態に限定しない。従って、この用語は、とりわけ、直線状DNA分子（例えば、制限フラグメント）、ウイルス、プラスミド、および染

( 9 )

特表2002-531146

色体に見出される二本鎖DNAを含む。

#### 【0018】

DNA「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に配置された場合、インビボで転写されポリペプチドに翻訳されるDNA配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンにより決定される。コード配列としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：原核生物配列、真核生物mRNA由来のcDNA、真核生物（例えは、哺乳動物）DNA由来ゲノムDNA配列、および合成DNA配列。ポリアデニル化シグナルおよび転写終止配列は、コード配列の3'側に位置付けされ得る。

#### 【0019】

本明細書において用いる場合、用語「ハイブリダイゼーション」は、反対側の核酸鎖の残基の間の水素結合により安定化された逆平行の二重鎖を形成する2つの核酸鎖の会合のプロセスをいう。

#### 【0020】

用語「オリゴヌクレオチド」は、短い（100塩基長未満）の核酸分子をいう。

#### 【0021】

本明細書において用いる場合、「DNA調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなどのような転写制御配列および翻訳制御配列である。これは、宿主細胞中のコード配列の発現を提供し、そして／または発現を調節する。

#### 【0022】

「プロモーター配列」は、細胞中のRNAポリメラーゼに結合し得、そして下流（3'方向）コード配列の転写を開始し得るDNA調節領域である。本発明を規定する目的のために、このプロモーター配列を、転写開始部位によりその3'末端で結合し、上記の検出可能バックグラウンドレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように上流（5'方向）に伸長する。プロモーター配列内に、転写開始部位、およびRNAポリメラーゼの結合の原因であるタンパク質結合ドメインが見出される。真核生物プロモーターは、しばし

ば（ただし常にではない）「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。種々のプロモーター（誘導プロモーターを含む）が、本発明の種々のベクターを駆動するために用いられ得る。

#### 【0023】

本明細書において用いる場合、用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」は、それぞれが特異的ヌクレオチド配列またはその近位で二本鎖DNAを切断する細菌酵素をいう。

#### 【0024】

細胞は、外因性DNAまたは異種DNAが細胞の内側に導入された場合、このようなDNAにより「形質転換」または「トランسفェクト」されている。形質転換するDNAは、細胞のゲノムに組み込まれてもよいし、または組み込まれなくても（共有結合）よい。原核生物細胞、酵母細胞および哺乳動物細胞において、例えば、形質転換DNAは、プラスミドのようなエピソームのエレメント上に維持され得る。真核生物細胞に関しては、安定に形質転換された細胞は、形質転換DNAが染色体に組み込まれており、それにより形質転換DNAが染色体複製を通じて娘細胞に遺伝される細胞である。この安定性は、この真核生物細胞が形質転換DNAを含む娘細胞の集団からなる細胞株またはクローンを樹立する能力により実証される。「クローン」は、単一の細胞または有糸分裂による共通の祖先に由来する細胞の集団である。「細胞株」は、多くの世代についてインビトロで安定に増殖し得る初代細胞のクローンである。

#### 【0025】

DNA構築物の「異種」領域は、事実上、より大きい分子との会合が見出されていない、より大きいDNA分子内の、同定可能なDNAセグメントである。従って、この異種領域が哺乳動物遺伝子をコードする場合、この遺伝子は、供給源の生物体のゲノム中の哺乳動物ゲノムDNAに隣接しないDNAと、通常隣接する。別の実施例では、異種DNAは、2つの異なる供給源由来の遺伝子の部分が（融合タンパク質産物を产生するように）一緒にされている構築物中にコード配列を含む。対立遺伝子改変体または天然に存在する変異事象は、本明細書において規定されるようなDNAの異種領域を生じない。

( 11 )

特表2002-531146

## 【0026】

本明細書において用いる場合、用語「レポーター遺伝子」は、異種プロモーターまたはエンハンサー要素に結合したコード配列（そしてその産物は、その構築物が組織または細胞中に導入される場合、容易にそして定量的にアッセイされ得る）をいう。

## 【0027】

本明細書において記載されるアミノ酸は、「L」異性体形態であることが好ましい。このアミノ酸配列は、1文字コードで与えられる（A：アラニン；C：システィン；D：アスパラギン酸；E：グルタミン酸；F：フェニルアラニン；G：グリシン；H：ヒスチジン；I：イソロイシン；K：リジン；L：ロイシン；M：メチオニン；N：アスパラギン；P：プロリン；Q：グルタミン；R：アルギニン；S：セリン；T：トレオニン；V：バリン；W：トリプトファン；Y：チロシン；X：任意の残基）。NH<sub>2</sub>は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離のアミノ基をいう。COOHは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離のカルボキシ基をいう。標準的ポリペプチド命名法に従って、J. Biol. Chem. 243 (1969)、3552~59を用いる。

## 【0028】

本発明は、amFP486、cFP484、zFP506、zFP538、dsFP483、drFP583、asFP600、dgFP512およびdmFP592からなる群より選択される単離かつ精製された蛍光タンパク質に関する

## 【0029】

本発明の1つの実施形態において、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供される。この方法は、サンプル中の核酸配列の存在についてのスクリーニングの工程であって、ここで、この核酸配列は、配列番号3、5、8、11、12および14からなる群より選択される配列を有するペプチドをコードする工程、を包含する。核酸配列の存在は、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

## 【0030】

本発明の別の実施形態において、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供される。この方法は、サンプル中の核酸配列の存在についてのスクリーニングの工程であって、ここで、この核酸配列は、配列番号4、6、7、9、10、13、15および16からなる群より選択されるプライマーにハイブリダイズする工程、を包含する。核酸配列の存在は、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

#### 【0031】

本発明のなお別の実施形態において、細胞中の蛍光タンパク質を分析する方法が提供される。この方法は、細胞中の配列番号55～63からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する蛍光タンパク質をコードする核酸配列を発現する工程；およびこのタンパク質由来の蛍光シグナルを測定する工程、を包含する。この方法は、さらにシグナルに従って細胞をソートする工程を包含する。好ましくは、この細胞は蛍光発色セルソーティング (fluorescence activated cell sorting: 蛍光標示式細胞ソーティング) によりソートされる。なお好ましくは、この核酸配列は、蛍光タンパク質に融合される（ここで目的のタンパク質は蛍光タンパク質とは別である）、目的のタンパク質をコードする目的の遺伝子を含む。検出された蛍光シグナルは、目的の遺伝子、およびさらに細胞中の目的のタンパク質の存在を示す。蛍光タンパク質の細胞内位置を同定することにより、目的のタンパク質の細胞内位置がまた同定される。

#### 【0032】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を例示する目的のために与えられ、そしていかなる様式でも本発明を限定することは意図されない。

#### 【0033】

(実施例1)

(生物学的材料)

新規な蛍光タンパク質を、Anthozoaのいくつかの属から同定した。これらの属は、いかなる生物発光も示さないが、通常の白色光または紫外光の下で観察した場合に、蛍光色を有する。6つの种を選択した（表1を参照のこと）。

#### 【0034】

【表1】

(表1)

(この研究において使用したAnthozoaの種)

種	起源の領域	蛍光色
Anemonia majano	西太平洋	明緑色の触手端(tentacle tip)
Clavularia sp.	西太平洋	明緑色の触手および口の円盤 (oral disk)
Zoanthus sp.	西太平洋	黄緑色の触手および口の円盤
Discosoma sp. 「赤」	西太平洋	口の円盤上の橙-赤の斑点 (spot oral disk)
Discosoma striata	西太平洋	口の円盤上の青-緑の縞
Discosoma sp. 「マゼンタ」	西太平洋	かすかに紫色の口の円盤
Discosoma sp. 「緑」	西太平洋	口の円盤上の緑の斑点
Anemonia sulcata	地中海	紫色の触手端

(実施例2)

(cDNAの調製)

全RNAを、ChomczynskiおよびSacchi (Chomczynski P. ら、Anal. Biochem. 162 (1987)、156~159) のプロトコルに従って、目的の種から単離した。第1鎖cDNAを、SMART PCR cDNA合成キット (CLONTECH) を提供されたプロトコルに従って使用して、1~3 μgの全RNAから開始して合成したが、唯一、このキット中に提供された「cDNA合成プライマー」をプライマーTN3 (5' - CGCAGTCGACCG (T)<sub>13</sub>、配列番号1) (表2) で置き換える変更を行った。次いで、増幅されたcDNAサンプルを、提供されたプロトコルに記載されたように調製したが、ただし、PCRに使用した2つのプライマーがT Sプライマー (5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT、配列

(14)

特表2002-531146

番号2) (表2) およびTN3プライマー(表2)であった(ともに、0. 1μMの濃度)ことが異なる。20~25回のPCRサイクルを実施して、cDNAサンプルを増幅した。この増幅されたcDNAを水で20倍希釈し、そしてこの希釈物のうちの1μlを、続く手順にて使用した。

【0035】

(表2)

cDNA合成およびRACEにて使用したオリゴ

【0036】

[表2]

TN3: 5'-CGCAGTCGACCG(T)<sub>13</sub>  
(配列番号1)

T7-TN3: 5'-GTAATACGACTCACTATAAGGCCGCAGTCGACCG(T)<sub>13</sub>  
(配列番号17)

TS-プライマー: 5'-AAGCAGTGGTATCACCGCAGAGT  
(配列番号2)

T7-TS:  
5'-GTAATACGACTCACTATAAGGCAAGCAGTGGTATCACCGCAGAGT  
(配列番号18)

T7: 5'-GTAATACGACTCACTATAAGGC  
(配列番号19)

TS-オリゴ: 5'-AAGCAGTGGTATCACCGCAGAGTACGCrGrGrG  
(配列番号53)

(実施例3)

(オリゴの設計)

新規な蛍光タンパク質のcDNAのフラグメントを単離するために、縮重プライマーを使用するPCRを実施した。縮重プライマーは、蛍光タンパク質のファミリー中で最も変化しないと予測された領域におけるmRNAの配列と一致する

ように設計した。このような4つのストレッチを選択し(表3)、そして縮重プライマーの変異体を設計した。このようなプライマーはすべて、mRNAの3'末端に關した。すべてのオリゴを、使用前にゲル精製した。表2は、cDNA合成およびRACEにおいて使用したオリゴを示す。

## 【0037】

(表3)

(重要なアミノ酸ストレッチおよび蛍光タンパク質の単離のために使用した対応縮重プライマー)

## 【0038】

【表3】

A. victoria GFP (7) 1-133 ストレチング遺伝子	重要なストレッチの アミノ酸配列	縮重プライマーの 名前 および 配列
20-25	GXVN GH (配列番号 3)	NGH: 5'- GA(C,T) GGC TGC GT(A,T,G,C) AA(T,C) GG(A,T,G) CA (配列番号 4)
31-35	GEGEG (配列番号 5)	GEGA: 5'- GTT ACA GGT GA(A,G) GG(A,C) GA(A,G) GG (配列番号 6) GEGb: 5'- UTT ACA GGT GA(A,G) GG(T,G) GA(A,G) GG (配列番号 7)
	GEGNG (配列番号 8)	GNGa: 5'- GTT ACA GGT GA(A,G) GG(A,C) AA(C,T) GG (配列番号 9) GNGb: 5'- GTT ACA GGT GA(A,G) GG(T,G) AA(C,T) GG (配列番号 10)
127-131	GMNFP (配列番号 11) GVNFP (配列番号 12)	NFP: 5' TTC CA(C,T) GGT (G,A)TG AA(C,T) TT(C,T) CC (配列番号 13)
134-137	GPVM (配列番号 14)	PVMa: 5' CCT GCC (G,A)A(C,T) GGT CC(A,T,G,C) GT(A,C) ATG (配列番号 15) PVMb: 5' CCT GCC (G,A)A(C,T) GGT CC(A,T,G,C) GT(G,T) ATG (配列番号 16)

(実施例4)

(16)

特表2002-531146

## (nFPの3' - cDNAフラグメントの単離)

3' - RACEの改変型ストラテジーを使用して、標的フラグメントを単離した（図1を参照のこと）。このRACEストラテジーは、連続する2つのPCR工程を含んだ。第1のPCR工程は、第1の縮重プライマー（表4）およびcDNA合成のために使用されたTN3プライマーと同一の3'部分を有する、T7-TN3プライマー（配列番号17）（T7-TN3の配列については、表2）を含んだ。このPCR工程において長い方であるT7-TN3プライマーを置き換えた理由は、短い方であるTN3プライマーを使用した場合、特にT7-TN3プライマーを低濃度（0.1 μM）にて使用した場合に、生じるバックグラウンド增幅が効果的に抑制されたことである（Frohmanら（1998）PNAS USA, 85, 8998~9002）。第2のPCR工程は、TN3プライマー（配列番号1、表2）および第2の縮重プライマー（表4）を含んだ。

【0039】

## （表4）

（nFP cDNAの3' フラグメントの特異的増幅を生じる、第1および第2のPCRのための縮重プライマーの組み合わせ）

【0040】

## 【表4】

(17)

特表2002-531146

種	第1の縮重 プライマー	第2の縮重プライマー
Anemonia majano	NGH (配列番号4)	GNGb (配列番号10)
Clavularia sp.	NGH (配列番号4)	GEGa (配列番号6)
Zoanthus sp.	NGH (配列番号4)	GEGa (配列番号6)
Discosoma sp. "赤"	NGH (配列番号4)	GEGa (配列番号6), NFP (配列番号13) または PVMb (配列番号16)
Discosoma striata	NGH (配列番号4)	NFP (配列番号13)
Anemonia sulcata	NGH (配列番号4)	GEGa (配列番号6) または NFP (配列番号13)

第1のPCR反応を、以下のように実施した：増幅されたcDNAサンプルの20倍希釈物1μlを反応混合物に添加した。この反応混合物は、提供された緩衝液を含む1×Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、200μM dNTP、0.3μMの第1の縮重プライマー(表4)および0.1μMのT7-TN3(配列番号17)プライマーを、総量20μlにて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の(Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード)であった：95℃で10秒、55℃で1分、72℃で40秒を1サイクル；95℃で10秒、62℃で30秒、72℃で40秒を24サイクル。次いで、この反応物を水で20倍希釈し、そしてこの希釈物のうちの1μlを第2のPCR反応物に添加した。この第2のPCR反応物は、製造業者により提供された緩衝液を含む1×Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、200μM dNTP、0.3μMの第

2の縮重プライマー（表4）および0.1 $\mu$ MのTN3プライマーを含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の（Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード）であった：95℃で10秒、55℃（GEG/GNGまたはPVMに関して）または52℃（NFPに関して）で1分、72℃で40秒を1サイクル；95℃で10秒、62℃（GEG/GNGまたはPVMに関して）または58℃（NFPに関して）で30秒、72℃で40秒を13サイクル。PCRの産物を、製造業者のプロトコルに従って、PCR-Scriptベクター（Stratagene）中にクローニングした。

#### 【0041】

縮重プライマーの異なる組み合わせを、各種由来のDNAに対する第1および第2のPCR反応において試し続けて、特異的増幅を生じるプライマーの組み合わせを見出した。この特定の増幅とは、予期されるサイズの顕著なバンド（NGHおよびGEG/GNGについて約650～800bp、そしてNFPおよびPVMについて約350～500bp（時に、少数の弱いバンドを伴う））が、2つのPCR反応後にアガロースゲル上で検出されたことを意味する。Anthozoa綱の異なる種についてのプライマーの選り抜きの組み合わせを、表4に列挙する。プライマーの他のいくつかの組み合わせもまた、正確なサイズのフラグメントの増幅を生じたが、これらのフラグメントの配列は、同定された他の蛍光タンパク質またはAequorea victoria GFPに対して、相同性を示さなかった。

#### 【0042】

##### （実施例5）

##### （全長cDNAのコピーの取得）

得られた新規な蛍光タンパク質cDNAの3' フラグメントを配列決定する際に、2つの5' 指向性（directed）入れ子（nested）プライマーをcDNAについて合成し（表5）、次いでこのcDNAの5' 末端を、連続する2つのPCRを使用して増幅した。その次のPCR反応において、「ステップアウトPCR」という新規なアプローチを使用して、バックグラウンドの増幅を

抑制した。このステップアウト反応混合物は、製造業者により提供された緩衝液を用いる  $1 \times$  Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、 $200 \mu\text{M}$  dNTP、 $0.2 \mu\text{M}$  の第1の遺伝子特異的プライマー（表5を参照のこと）、 $0.02 \mu\text{M}$  のT7-TSプライマー（配列番号18）、 $0.1 \mu\text{M}$  のT7プライマー（配列番号19）および増幅されたcDNAサンプルの20倍希釈物 $1 \mu\text{l}$ を、総容量 $20 \mu\text{l}$ にて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の (Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード) であった： $95^\circ\text{C}$ で10秒、 $60^\circ\text{C}$ で30秒、 $72^\circ\text{C}$ で40秒を23～27サイクル。増幅の産物を水で50倍希釈し、そしてこの希釈物のうちの $1 \mu\text{l}$ を、第2の（入れ子）PCRに添加した。この反応は、提供された緩衝液を含む  $1 \times$  Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、 $200 \mu\text{M}$  dNTP、 $0.2 \mu\text{M}$  の第2の遺伝子特異的プライマーおよび $0.1 \mu\text{M}$  のTSプライマー（配列番号2）を、総容量 $20 \mu\text{l}$ にて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の (Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード) であった： $95^\circ\text{C}$ で10秒、 $60^\circ\text{C}$ で30秒、 $72^\circ\text{C}$ で40秒を12サイクル。次いで増幅の産物を、製造業者のプロトコルに従って、pAtlasベクター (CLONTECH) 中にクローニングした。

【0043】

(表5)

(5' - RACEに使用した遺伝子特異的プライマー)

【0044】

【表5】

( 20 )

特表2002-531146

種	第 1 の プライマー	第 2 の (上流) プライマー
Anemonia majano	5'-GAAATAGTCAGGCATACTGGT (配列番号 20)	5'-GTCAGGCATAC TGGTAGGAT (配列番号 21)
Clavularia sp.	5'-CTTGAAATAGTCTGCTATATC (配列番号 22)	5'-TCTGCTATATC GTCTGGGT (配列番号 23)
Zoanthus sp.	5'- GTTCTTGAATAGTCTACTATGT (配列番号 24)	5'-GTCTACTATGTCTT GAGGAT (配列番号 25)
Discosoma sp. "赤"	5'-CAAGCAAATGGCAAAGGTC (配列番号 26)	5'-CGGTATTGTGGCC TTCGTA (配列番号 27)
Discosoma striata	5'-TTGTCTTCTTCTGCACAAC (配列番号 28)	5'-CTGCACAAACGG GTCCAT (配列番号 29)
Anemonia sulcata	5'-CCTCTATCITCATTTCTGC (配列番号 30)	5'-TATCTTCATTTCT GCGTAC (配列番号 31)
Discosoma sp. "マゼンタ"	5'-TTCAGCACCCCCATCACGAG (配列番号 32)	5'-ACGCTCAGAGCTG GGTTCC (配列番号 33)
Discosoma sp. "緑"	5'-CCCTCAGCAATCCATCACGTT (配列番号 34)	5'-ATTATCTCAGTGGA TGGTTC (配列番号 35)

(実施例 6)

(E. coli における n FP の発現)

新規な蛍光タンパク質発現のためのDNA構築物を調製するために、以下の2つのプライマーを各DNAについて合成した：そのcDNAの3' -UTRに位置するアニーリング部位を有する5'指向性「下流」プライマー、および翻訳開始部位（最初のATGコドンを含まない）の部位に対応する3'指向性「上流」

( 21 )

特表2002-531146

プライマー(表6)。両方のプライマーは、制限エンドヌクレアーゼについての部位をコードする5' - ヒール(heel)を有した;さらに、この上流プライマーは、そのPCR産物をpQE30ベクター(Qiagen)中に、このベクターにコードされる6×HisタグとNFPのリーディングフレームの融合が生じるような様式でクローニングすることを可能にするように設計した。PCRを以下のように実施した:増幅されたcDNAサンプルの20倍希釈物1μlを反応混合物に添加した。この反応混合物は、製造業者により提供された緩衝液を含む1×Advantage KlenTaq Polymerase Mix(CLONTECH)、200μM dNTP、0.2μMの上流プライマーおよび0.2μMの下流プライマーを、最終容量20μlにて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の(Hybaid OmniGene Thermo cycler、チュープコントロールモード)であった:95℃で10秒、60℃で30秒、72℃で40秒を23~27サイクル。この増幅工程の産物を、フェノールークロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製し、次いで標準的プロトコルに従ってこのプライマーの配列に対応する制限エンドヌクレアーゼを使用して、pQE30ベクター中にクローニングした。

#### 【0045】

すべてのプライマーを、XL-1 blue E. coli 中にて増幅し、そしてプラスミドDNAミニプレップキット(CLONTECH)によって精製した。この組換えクローンを、コロニーの色によって選択し、そして3mlのLB培地(100μg/mlのアンピシリンを補充)中にて37℃で一晩増殖させた。この一晩培養物100μlを、100μg/mlのアンピシリンを含む新鮮なLB培地200mlに移し、そして37℃、200rpmにて、OD<sub>600</sub>0.6~0.7まで増殖させた。次いで、1mM IPTGをこの培養物に添加し、そしてインキュベーションを、37℃でさらに16時間進行させた。この細胞を収集し、そして組換えタンパク質(N末端に6×Hisタグを組み込んでいる)を、製造業者のプロトコルに従って、TALON™金属アフィニティー樹脂(CLONTECH)を使用して精製した。

#### 【0046】

( 22 )

特表2002-531146

(表6)

(発現構築物へとクローニングするためにnFPの全長コード領域を得るために  
に使用したプライマー)

【0047】

【表6】

種	上流プライマー	下流プライマー
Anemonia majano	5' -acaatggatcccgcttttcaaca atgttatac (配列番号 36) BamHI	5'-tagtacccgagcttattcgta tttcagtgaatc (配列番号 37) Xhol
Clavularia sp.	L: 5'-acaatggatccaaacatttttga gaaacg (配列番号 38) BamHI S: 5'-acaatggatccaaaggcttaacc accatg (配列番号 39) BamHI	5'-tagtacccgagcaacacaa accctcagacaa (配列番号 40) Xhol
Zoanthus sp.	5'- acatggatccgcgtcgatcaaag cacgg (配列番号 41) BamHI	5'-tagtacccgagggttggactacat tctttatca (配列番号 42) Xhol
Discosoma sp. "赤"	5'- acaatggatccaggctttccaagaat gttatac (配列番号 43) BamHI	5'-tagtacccgaggagccaaatgc agcccta (配列番号 44) Xhol
Discosoma striata	5'- acaatggatccaggatggtccaaagatgtg (配列番号 45) BamHI	5'-tagccggccatcatgcctc gtcacct (配列番号 46) SacI
Anemonia sulcata	5'- acaatggatcccgcttttttaaaaagaagact (配列番号 47) BamHI	5'-tagtacccgagtccctgggagc ggcttg (配列番号 48) Xhol
Discosoma sp. "イエロー"	5'- acaatggatccaggatgttccaaagaatgtat (配列番号 49) BamHI	5'-tagtacccgaggccattacg ctaatac (配列番号 50) Xhol
Discosoma sp. "紫"	5'-acatggatccaggatgcacttaaaaagaagaaat (配列番号 51)	5'-tagtacccgagattcggtttaat gccttg (配列番号 52)

(実施例7)

(新規な蛍光タンパク質およびこのタンパク質をコードするcDNA)

蛍光タンパク質をコードする7つの全長cDNAを得(配列番号45~51)

、そして7つの新規な蛍光タンパク質を産生した(配列番号53~59)。これらの単離された新規な蛍光タンパク質のスペクトル特性を表7に示し、そしてこ

( 23 )

特表2002-531146

れらの新規なタンパク質についての発光スペクトルおよび励起スペクトルを、表3～11に示す。

【0048】

(表7)

(単離したNFPのスペクトル特性)

【0049】

【表7】

種	NFP 名	最大 吸収 n m	最大発光 n m	最大励起 係数	相対量子 收率 *	相対輝度 **
Anemonia majano	amFP486	458	486	40,000	0.3	0.43
Clavularia sp.	cFP484	456	484	35,300	0.6	0.77
Zoanthus sp.	zFP506	496	506	35,600	0.79	1.02
Zoanthus sp.	zFP538	528	538	20,200	0.52	0.38
Discosoma sp. "赤"	drFP583	558	583	22,500	0.29	0.24
Discosoma striata	dsFP483	443	483	23,900	0.57	0.50
Anemonia sulcata	asFP600	572	596	56,200	<0.001	-
Discosoma sp "赤系"	dgFP512	502	512	20,360	0.3	0.21
Discosoma sp. "マゼンタ"	dmFP592	573	593	21,800	0.11	0.09

\* 相対量子收率は、A. victoria GFPの量子收率と比較して決定した。

\*\* 相対輝度は、励起係数に量子收率を掛けて、A. victoria GFPについての量子收率で割ったものである。

【0050】

蛍光タンパク質の多重整列を図2Aに示す。番号付けは、Aequorea

victoriaのグリーン蛍光タンパク質(GFP、配列番号54)に基づく。これらの新規な蛍光タンパク質のアミノ酸配列に、配列番号55~63と名付ける。Zoanthus由来の2つのタンパク質およびDiscosoma由来の4つのタンパク質を、互いの間で比較する:このシリーズの第1のタンパク質中の対応残基と同一である残基を、ダッシュによって示す。導入されたギャップを、点によって示す。A. victoria GFPの配列において、 $\beta$ シートを形成するストレッチに下線を付す:側鎖がこの $\beta$ -strandの内側を形成する残基に影を付ける。図2Bは、CFP484のN末端部分を示す、この部分は、他のタンパク質との相同性を有さない。推定シグナルペプチドに下線を付す。

#### 【0051】

以下の参考文献を、本明細書中に引用した。

1. Ormoら(1996) Science 273:1392~1395.
2. Yang, F. ら(1996) Nature Biotech 14:1246~1251.
3. Cormackら(1996) Gene 173, 33~38.
4. Haasら(1996) Current Biology 6, 315~324.
5. Yangら(1996) Nucleic Acids Research 24, 4592~4593.
6. Ghodaら(1990) J. Biol. Chem. 265:11823~11826.
7. Prasher D. C. ら(1992) Gene 111:229~33.
8. Kainら(1995) Biotechniques 19 (4) 650~55.
9. Chomczynski P. ら(1987) Anal. Biochem. 162, 156~159.
10. Frohmanら(1998) PNAS USA, 85, 8998~9002.

**【0052】**

本明細書中で言及されるいづれの特許または刊行物も、本発明が属する分野の当業者レベルの指標である。これらの特許および刊行物は、各個々の刊行物が参考として援用されると詳細かつ個別に示されたのと同じ程度に、参考として本明細書中で援用される。

**【0053】**

本発明が、言及された対象を実行しそして目的および利益を得るため、ならびに本発明に固有の対象を実行しそして目的および利益を得るために、十分に適合されることを、当業者は容易に理解する。これらの実施例は、本明細書中に記載の方法、手順、処理、分子、および特定の化合物とともに、好ましい実施形態の現在の代表であり、例示であり、そして本発明の範囲に対する限定としては意図されない。特許請求の範囲の範囲によって規定されるような本発明の意図内に包含される、本発明における変化および他の使用は当業者が思い付く。

**【配列表】**

( 26 )

特表2002-531146

## SEQUENCE LISTING

5                    <110> Lukyanov, Sergey A.  
                      Labas, Yulii A.  
                      Matz, Mikhail V.  
                      Pradkov, Arcady F.  
10                  <120> Fluorescent proteins from non-bioluminescent  
                      species of Class Anthozoa, genes encoding such  
                      proteins and uses thereof  
                      D6196PCT  
15                  <141> 1999-12-10  
                      <150> 09/210,330  
                      <151> 1998-12-11  
                      <160> 63  
  
15                  <210> 1  
                      <211> 25  
                      <212> DNA  
                      <213> artificial sequence  
                      <220>  
20                  <221> primer\_bind  
                      <223> primer TN3 used in cDNA synthesis and RACE  
                      <400> 1  
  
25                  cgcaagtgcac cgttttttt ttttt 25  
  
25                  <210> 2  
                      <211> 23  
                      <212> DNA  
                      <213> artificial sequence  
                      <220>  
30                  <221> primer\_bind  
                      <223> primer TS used in cDNA synthesis and RACE  
                      <400> 2  
  
35                  aagcagtgggt atcaacgcag agt 23  
  
35                  <210> 3  
                      <211> 6  
                      <212> PRT

( 27 )

特表2002-531146

<213> Aequorea victoria  
<220>  
<222> 21  
<223> amino acid sequence of a key stretch on which  
5 primer NGH is based; Xaa at position 21  
represents unknown  
<400> 3

Gly Xaa Val Asn Gly His  
5

10 <210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
15 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> 12  
<223> primer NGH used for isolation of fluorescent  
protein; n at position 12 represents any of the  
20 four bases  
<400> 4

gayggctgcg tnaayggdca 20

25 <210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Aequorea victoria  
<220>  
<222> 31..35  
30 <223> amino acid sequence of a key stretch on which  
primers GEGa and GEGb are based  
<400> 5

Gly Glu Gly Glu Gly  
5

35 <210> 6  
<211> 20

( 28 )

特表2002-531146

<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
5 <223> primer GEGa used for isolation of fluorescent  
protein  
<400> 6

gttacaggtg argggmarggg 20

10 <210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
15 <221> primer\_bind  
<223> primer GEGb used for isolation of fluorescent  
protein  
<400> 7

gttacaggtg arggkkgargg 20

20 <210> 8  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Aequorea victoria  
25 <220>  
<222> 31...35  
<223> amino acid sequence of a key stretch on which  
primers GNGa and GNGb are based  
<400> 8

30 Gly Glu Gly Asn Gly  
5

<210> 9  
<211> 20  
35 <212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>

( 29 )

特表2002-531146

<221> primer\_bind  
<223> primer GNGa used for isolation of fluorescent protein  
<400> 9

5 gttacaggtg arggmaaygg 20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
10 <213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
<223> primer GNGb used for isolation of fluorescent protein  
15 <400> 10

gttacaggtg arggkaaygg 20

<210> 11  
<211> 5  
20 <212> PRT  
<213> Aequorea victoria  
<220>  
<222> 127...131  
<223> amino acid sequence of a key stretch on which  
25 primer NFP is based  
<400> 11

Gly Met Asn Phe Pro  
5

30 <210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Aequorea victoria  
<220>  
35 <222> 127...131  
<223> amino acid sequence of a key stretch on which  
primer NFP is based

( 30 )

特表2002-531146

&lt;400&gt; 12

Gly Val Asn Phe Pro

5

5 <210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
10 <221> primer\_bind  
<223> primer NFP used for isolation of fluorescent  
protein  
<400> 13

ttccayggtr tgaayttycc

20

15 <210> 14  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Aequorea victoria  
20 <220>  
<222> 134..137  
<223> amino acid sequence of a key stretch on which  
primers PVMa and PVMb are based  
<400> 14

25 Gly Pro Val Met

30 <210> 15  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> 15  
35 <223> primer PVMa used for isolation of fluorescent  
protein; n at position 15 represents any of the

( 31 )

特表2002-531146

four bases

	<400>	15	
	cctgccrayg gtccngtmat g		
5	<210>	16	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
10	<221>	primer_bind	
	<222>	15	
	<223>	primer PVMB used for isolation of fluorescent protein; n at position 15 represents any of the four bases	
15	<400>	16	
	cctgccrayg gtccngtkat g		
	<210>	17	
	<211>	47	
20	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	primer T7-TN3 used in cDNA synthesis and RACE	
25	<400>	17	
	gtaatacgac tcactatagg gccgcagtgc accgtttttt tttttttt		
	<210>	18	
	<211>	45	
30	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	primer T7-TS used in cDNA synthesis and RACE	
35	<400>	18	
	gtaatacgac tcactatagg gcaaggagtg gtatcaacgc agagt		

( 32 )

特表2002-531146

5           <210>    19  
          <211>    22  
          <212>    DNA  
          5        <213>    artificial sequence  
          <220>  
          <221>    primer\_bind  
          <223>    primer T7 used in cDNA synthesis and RACE  
          <400>    19

10      gtaatacgac tcactatagg gc                   22

15           <210>    20  
          <211>    21  
          <212>    DNA  
          15        <213>    artificial sequence  
          <220>  
          <221>    primer\_bind  
          <223>    gene-specific primer used for 5'-RACE for  
                  Anemonia majano  
          20        <400>    20

          gaaatagtca ggcatactgg t                   21

25           <210>    21  
          <211>    20  
          <212>    DNA  
          25        <213>    artificial sequence  
          <220>  
          <221>    primer\_bind  
          <223>    gene-specific primer used for 5'-RACE for  
                  Anemonia majano  
          30        <400>    21

          gtcaggcata ctggtaggat                   20

35           <210>    22  
          35        <211>    21

( 33 )

特表2002-531146

<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
5 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for  
*Clavularia sp.*  
<400> 22

cttgaaatag tctgctatat c 21

- 10 <210> 23  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
15 <221> primer\_bind  
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for  
*Clavularia sp.*  
<400> 23

tctgctatat cgtctgggt 19

20 <210> 24  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
25 <220>  
<221> primer\_bind  
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for  
*Zoanthus sp.*  
<400> 24

30 gttcttgaaa tagtctacta tgt 23

<210> 25  
<211> 20  
<212> DNA  
35 <213> artificial sequence

( 34 )

特表2002-531146

<220>  
<221> primer\_bind  
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for  
Zoanthus sp.  
5 <400> 25  
gtctactatg tcttgaggat 20

<210> 26  
<211> 19  
10 <212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for  
15 Discosoma sp. "red"  
<400> 26  
caagcaaatg gcaaaggc 19

<210> 27  
20 <211> 19  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
25 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for  
Discosoma sp. "red"  
<400> 27  
cggtattgtg gccttcgta 19

30 <210> 28  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
35 <221> primer\_bind  
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for

( 35 )

特表2002-531146

*Discosoma striata*

<400>	28	
ttgtcttctt ctgcacaac		19
5	<210>	29
	<211>	17
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
	<220>	
10	<221>	primer_bind
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for <i>Discosoma striata</i>
	<400>	29
ctgcacaacg ggtccat		17
15	<210>	30
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
20	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for <i>Anemonia sulcata</i>
	<400>	30
25	cctcttatctt catttcctgc	20
	<210>	31
	<211>	20
	<212>	DNA
30	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for <i>Anemonia sulcata</i>
35	<400>	31
tatcttcatt tcctgcgtac		20

( 36 )

特表2002-531146

	<210>	32
	<211>	19
	<212>	DNA
5	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for <i>Discosoma sp. "magenta"</i>
10	<400>	32
	ttcagcaccc catcacgag	19
	<210>	33
	<211>	19
15	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for <i>Discosoma sp. "magenta"</i>
20	<400>	33
	acgctcagag ctgggttcc	19
	<210>	34
25	<211>	22
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
30	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for <i>Discosoma sp. "green"</i>
	<400>	34
	ccctcagcaa tccatcacgt tc	22
35	<210>	35
	<211>	20
	<212>	DNA

( 37 )

特表2002-531146

	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
5	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for <i>Discosoma sp.</i> "green"	
	<400>	35	
	attatctcag tggatggttc		20
10	<210>	36	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
15	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Anemonia majano</i>	
	<400>	36	
	acatggatcc gctcttcaa acaagttat c		31
20	<210>	37	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
25	<221>	primer_bind	
	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Anemonia majano</i>	
	<400>	37	
	tagtactcga gcttattcgat attcagtga aatc		34
30			
	<210>	38	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
35	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region	

( 38 )

特表2002-531146

of nPPs from *Clavularia* sp.

<400>	38	
acatggatcc aacattttt tgagaaaacg		29
5	<210>	39
	<211>	28
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
	<220>	
10	<221>	primer_bind
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nPPs from <i>Clavularia</i> sp.
	<400>	39
acatggatcc aaagctctaa ccaccatg		28
15	<210>	40
	<211>	31
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
20	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nPPs from <i>Clavularia</i> sp.
	<400>	40
25	tagtactcga gcaacacaaa ccctcagaca a	31
	<210>	41
	<211>	28
	<212>	DNA
30	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nPPs from <i>Zoanthus</i> sp.
35	<400>	41
acatggatcc gctcagtcaa agcacggt		28

( 39 )

特表2002-531146

	<210>	42
	<211>	32
	<212>	DNA
5	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from Zoanthus sp.
10	<400>	42
	tagtactcga ggttggaaact acattcttat ca	32
	<210>	43
	<211>	31
15	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nFPs from Discosoma sp. "red"
20	<400>	43
	acatggatcc aggtttcca agaatgttat c	31
	<210>	44
25	<211>	29
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
30	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from Discosoma sp. "red"
	<400>	44
	tagtactcga ggagccaaagt tcagcctta	29
35	<210>	45
	<211>	28
	<212>	DNA

( 40 )

特表2002-531146

<213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
<223> upstream primer used to obtain full coding region  
5 of nPPs from *Discosoma striata*  
<400> 45

acatggatcc agttggtcca agagtgtg 28

<210> 46  
10 <211> 28  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<221> primer\_bind  
15 <223> downstream primer used to obtain full coding  
region of nPPs from *Discosoma striata*  
<400> 46

tagcgagctc tatcatgcct cgtcacct 28

20 <210> 47  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
25 <221> primer\_bind  
<223> upstream primer used to obtain full coding region  
of nPPs from *Anemonia sulcata*  
<400> 47

acatggatcc gcttccttt taaagaagac t 31

30 <210> 48  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
35 <220>  
<221> primer\_bind  
<223> downstream primer used to obtain full coding

( 41 )

特表2002-531146

region of nFPs from *Anemonia sulcata*

<400>	48	
tagtactcg a gtccttggga gcggcttg		28
5	<210>	49
	<211>	30
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
	<220>	
10	<221>	primer_bind
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Discosoma sp.</i> "magenta"
	<400>	49
	acatggatcc agttgttcca agaatgtgat	
15		30
	<210>	50
	<211>	26
	<212>	DNA
	<213>	artificial sequence
20	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Discosoma sp.</i> "magenta"
	<400>	50
25	tagtactcg a ggccattacg ctaatc	26
	<210>	51
	<211>	31
	<212>	DNA
30	<213>	artificial sequence
	<220>	
	<221>	primer_bind
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Discosoma sp.</i> "green"
35	<400>	51
	acatggatcc agtgcactta aagaagaaat g	
		31

( 42 )

特表2002-531146

	<210>	52	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
5	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Discosoma sp.</i> "green"	
10	<400>	52	
	tagtactcga gatcggttt aatgccttg		29
	<210>	53	
	<211>	33	
15	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	TS-oligo used in cDNA synthesis and RACE	
20	<400>	53	
	aagcagtggc atcaacgcag agtacgcgrgr grg		33
	<210>	54	
	<211>	238	
25	<212>	PRT	
	<213>	<i>Aequorea victoria</i>	
	<220>		
	<223>	amino acid sequence of GFP	
	<400>	54	
30	Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu		
	5	10	15
	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser		
	20	25	30
	Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys		
35	35	40	45
	Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu		
	50	55	60

( 43 )

特表2002-531146

	Val Thr Thr Phe Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro		
	65	70	75
	Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu		
	80	85	90
5	Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn		
	95	100	105
	Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val		
	110	115	120
	Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn		
10	125	130	135
	Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val		
	140	145	150
	Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe		
	155	160	165
15	Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp		
	170	175	180
	His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu		
	185	190	195
	Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp		
20	200	205	210
	Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr		
	215	220	225
	Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys		
	230	235	
25	<210>	55	
	<211>	229	
	<212>	PRT	
	<213>	Anemoneia majano	
30	<220>		
	<223>	amino acid sequence of amPP486	
	<400>	55	
	Met Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ile Gly Asp Asp Met Lys Met Thr		
	5	10	15
35	Tyr His Met Asp Gly Cys Val Asn Gly His Tyr Phe Thr Val Lys		
	20	25	30
	Gly Glu Gly Asn Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ser Thr		
	35	40	45

( 44 )

特表2002-531146

	Phe Lys Val Thr Met Ala Asn Gly Gly Pro Leu Ala Phe Ser Phe		
	50	55	60
	Asp Ile Leu Ser Thr Val Phe Lys Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr		
	65	70	75
5	Ala Tyr Pro Thr Ser Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro		
	80	85	90
	Asp Gly Met Ser Tyr Glu Arg Thr Phe Thr Tyr Glu Asp Gly Gly		
	95	100	105
	Val Ala Thr Ala Ser Trp Glu Ile Ser Leu Lys Gly Asn Cys Phe		
10	110	115	120
	Glu His Lys Ser Thr Phe His Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly		
	125	130	135
	Pro Val Met Ala Lys Lys Thr Thr Gly Trp Asp Pro Ser Phe Glu		
	140	145	150
15	Lys Met Thr Val Cys Asp Gly Ile Leu Lys Gly Asp Val Thr Ala		
	155	160	165
	Phe Leu Met Leu Gln Gly Gly Asn Tyr Arg Cys Gln Phe His		
	170	175	180
	Thr Ser Tyr Lys Thr Lys Lys Pro Val Thr Met Pro Pro Asn His		
20	185	190	195
	Val Val Glu His Arg Ile Ala Arg Thr Asp Leu Asp Lys Gly Gly		
	200	205	210
	Asn Ser Val Gln Leu Thr Glu His Ala Val Ala His Ile Thr Ser		
	215	220	225
25	Val Val Pro Phe		
	<210> 56		
	<211> 266		
30	<212> PRT		
	<213> Clavularia sp.		
	<220>		
	<223> amino acid sequence of cFP484		
	<400> 56		
35	Met Lys Cys Lys Phe Val Phe Cys Leu Ser Phe Leu Val Leu Ala		
	5	10	15
	Ile Thr Asn Ala Asn Ile Phe Leu Arg Asn Glu Ala Asp Phe Glu		

( 45 )

特表2002-531146

	20	25	30
	Glu Lys Thr Phe Arg Ile Pro Lys Ala Leu Thr Thr Met Gly Val		
	35	40	45
	Ile Lys Pro Asp Met Lys Ile Lys Leu Lys Met Glu Gly Asn Val		
5	50	55	60
	Asn Gly His Ala Phe Val Ile Glu Gly Glu Gly Lys Pro		
	65	70	75
	Tyr Asp Gly Thr His Thr Leu Asn Leu Glu Val Lys Glu Gly Ala		
	80	85	90
10	Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp Ile Leu Ser Asn Ala Phe Gln Tyr		
	95	100	105
	Gly Asn Arg Ala Leu Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Ala Asp Tyr		
	110	115	120
	Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Thr Met		
15	125	130	135
	Thr Phe Glu Asp Lys Gly Ile Val Lys Val Lys Ser Asp Ile Ser		
	140	145	150
	Met Glu Glu Asp Ser Phe Ile Tyr Glu Ile Arg Phe Asp Gly Met		
	155	160	165
20	Asp Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys		
	170	175	180
	Trp Glu Pro Ser Thr Glu Ile Met Tyr Val Arg Asp Gly Val Leu		
	185	190	195
	Val Gly Asp Ile Ser His Ser Leu Leu Leu Glu Gly Gly His		
25	200	205	210
	Tyr Arg Cys Asp Phe Lys Ser Ile Tyr Lys Ala Lys Lys Val Val		
	215	220	225
	Lys Leu Pro Asp Tyr His Phe Val Asp His Arg Ile Glu Ile Leu		
	230	235	240
30	Asn His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Thr Leu Tyr Glu Asn Ala		
	245	250	255
	Val Ala Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Ser Gln Ala		
	260	265	
35	<210>	57	
	<211>	230	
	<212>	PRT	

( 46 )

特表2002-531146

<213> Zoanthus sp.  
 <220>  
 <223> amino acid sequence of zFP506  
 <400> 57

5	Ala Gln Ser Lys His Gly Leu Thr Lys Glu Met Thr Met Lys Tyr		
	5	10	15
	Arg Met Glu Gly Cys Val Asp Gly His Lys Phe Val Ile Thr Gly		
	20	25	30
10	Glu Gly Ile Gly Tyr Pro Phe Lys Gly Lys Gln Ala Ile Asn Leu		
	35	40	45
	Cys Val Val Glu Gly Pro Leu Pro Phe Ala Glu Asp Ile Leu		
	50	55	60
	Ser Ala Ala Phe Asn Tyr Gly Asn Arg Val Phe Thr Glu Tyr Pro		
	65	70	75
15	Gln Asp Ile Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr		
	80	85	90
	Thr Trp Asp Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Ile		
	95	100	105
20	Cys Asn Ala Asp Ile Thr Val Ser Val Glu Glu Asn Cys Met Tyr		
	110	115	120
	His Glu Ser Lys Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro		
	125	130	135
	Val Met Lys Lys Met Thr Asp Asn Trp Glu Pro Ser Cys Glu Lys		
	140	145	150
25	Ile Ile Pro Val Pro Lys Gln Gly Ile Leu Lys Gly Asp Val Ser		
	155	160	165
	Met Tyr Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly Arg Leu Arg Cys Gln Phe		
	170	175	180
30	Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ser Val Pro Arg Lys Met Pro Asp		
	185	190	195
	Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Thr Arg Glu Asp Arg Ser Asp		
	200	205	210
	Ala Lys Asn Gln Lys Trp His Leu Thr Glu His Ala Ile Ala Ser		
	215	220	225
35	Gly Ser Ala Leu Pro		
	230		

( 47 )

特表2002-531146

	<210>	58	
	<211>	230	
	<212>	PRT	
5	<213>	Zoanthus sp.	
	<220>		
	<223>	amino acid sequence of zFP538	
	<400>	58	
	Met Ala His Ser Lys His Gly Leu Lys Glu Glu Met Thr Met Lys		
10	5	10	15
	Tyr His Met Glu Gly Cys Val Asn Gly His Lys Phe Val Ile Thr		
	20	25	30
	Gly Glu Gly Ile Gly Tyr Pro Phe Lys Gly Lys Gln Thr Ile Asn		
	35	40	45
15	Leu Cys Val Ile Glu Gly Pro Leu Pro Phe Ser Glu Asp Ile		
	50	55	60
	Leu Ser Ala Gly Phe Lys Tyr Gly Asp Arg Ile Phe Thr Glu Tyr		
	65	70	75
	Pro Gln Asp Ile Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly		
20	80	85	90
	Tyr Thr Trp Gly Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Ile		
	95	100	105
	Cys Asn Val Asp Ile Thr Val Ser Val Lys Glu Asn Cys Ile Tyr		
	110	115	120
25	His Lys Ser Ile Phe Asn Gly Met Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro		
	125	130	135
	Val Met Lys Lys Met Thr Thr Asn Trp Glu Ala Ser Cys Glu Lys		
	140	145	150
	Ile Met Pro Val Pro Lys Gln Gly Ile Leu Lys Gly Asp Val Ser		
30	155	160	165
	Met Tyr Leu Leu Lys Asp Gly Gly Arg Tyr Arg Cys Gln Phe		
	170	175	180
	Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ser Val Pro Ser Lys Met Pro Glu		
	185	190	195
35	Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Leu Arg Glu Asp Arg Ser Asp		
	200	205	210
	Ala Lys Asn Gln Lys Trp Gln Leu Thr Glu His Ala Ile Ala Phe		
	215	220	225

( 48 )

特表2002-531146

Pro Ser Ala Leu Ala

230

5	<210>	59		
	<211>	232		
	<212>	PRT		
	<213>	<i>Discosoma striata</i>		
	<220>			
10	<223>	amino acid sequence of dsFP483		
	<400>	59		
	Met Ser Cys Ser Lys Ser Val Ile Lys Glu Glu Met Leu Ile Asp			
	5	10	15	
	Leu His Leu Glu Gly Thr Phe Asn Gly His Tyr Phe Glu Ile Lys			
15	20	25	30	
	Gly Lys Gly Lys Gly Gln Pro Asn Glu Gly Thr Asn Thr Val Thr			
	35	40	45	
	Leu Glu Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Gly Trp His Ile			
	50	55	60	
20	Leu Cys Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Asn Lys Ala Phe Val His His			
	65	70	75	
	Pro Asp Asn Ile His Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly			
	80	85	90	
	Tyr Thr Trp Glu Arg Ser Met His Phe Glu Asp Gly Gly Leu Cys			
25	95	100	105	
	Cys Ile Thr Asn Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asn Cys Phe Tyr Tyr			
	110	115	120	
	Asp Ile Lys Phe Thr Gly Leu Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val			
	125	130	135	
30	Val Gln Lys Lys Thr Thr Gly Trp Glu Pro Ser Thr Glu Arg Leu			
	140	145	150	
	Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Ile Gly Asp Ile His His Ala Leu			
	155	160	165	
	Thr Val Glu Gly Gly His Tyr Ala Cys Asp Ile Lys Thr Val			
35	170	175	180	
	Tyr Arg Ala Lys Lys Ala Ala Leu Lys Met Pro Gly Tyr His Tyr			
	185	190	195	

( 49 )

特表2002-531146

	Val Asp Thr Lys Leu Val Ile Trp Asn Asn Asp Lys Glu Phe Met		
	200	205	210
	Lys Val Glu Glu His Glu Ile Ala Val Ala Arg His His Pro Phe		
	215	220	225
5	Tyr Glu Pro Lys Lys Asp Lys		
	230		
	<210>	60	
	<211>	225	
10	<212>	PRT	
	<213>	<i>Discosoma sp. "red"</i>	
	<220>		
	<223>	amino acid sequence of drFP583	
	<400>	60	
15	Met Arg Ser Ser Lys Asn Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys		
	5	10	15
	Val Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu		
	20	25	30
	Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Asn Thr Val Lys		
20	35	40	45
	Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile		
	50	55	60
	Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His		
	65	70	75
25	Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly		
	80	85	90
	Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val		
	95	100	105
	Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Cys Phe Ile Tyr		
30	110	115	120
	Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val		
	125	130	135
	Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu		
	140	145	150
35	Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile His Lys Ala Leu		
	155	160	165
	Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu Phe Lys Ser Ile		
	170	175	180

( 50 )

特表2002-531146

	Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val		
	185	190	195
	Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile		
	200	205	210
5	Val Glu Gln Tyr Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe Leu		
	215	220	225
	<210> 61		
	<211> 232		
10	<212> PRT		
	<213> Anemonia sulcata		
	<220>		
	<223> amino acid sequence of asFP600		
	<400> 61		
15	Met Ala Ser Phe Leu Lys Lys Thr Met Pro Phe Lys Thr Thr Ile		
	5	10	15
	Glu Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Lys Cys Thr Gly Lys Gly		
	20	25	30
	Glu Gly Asn Pro Phe Glu Gly Thr Gln Glu Met Lys Ile Glu Val		
20	35	40	45
	Ile Glu Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe His Ile Leu Ser Thr		
	50	55	60
	Ser Cys Met Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys Tyr Val Ser Gly		
	65	70	75
25	Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp		
	80	85	90
	Glu Arg Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Phe Leu Thr Ala His		
	95	100	105
	Gln Asp Thr Ser Leu Asp Gly Asp Cys Leu Val Tyr Lys Val Lys		
30	110	115	120
	Ile Leu Gly Asn Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Asn		
	125	130	135
	Lys Ala Gly Arg Trp Glu Pro Ala Thr Glu Ile Val Tyr Glu Val		
	140	145	150
35	Asp Gly Val Leu Arg Gly Gln Ser Leu Met Ala Leu Lys Cys Pro		
	155	160	165
	Gly Gly Arg His Leu Thr Cys His Leu His Thr Thr Tyr Arg Ser		
	170	175	180

( 51 )

特表2002-531146

Lys Lys Pro Ala Ser Ala Leu Lys Met Pro Gly Phe His Phe Glu  
                  185                     190                 195  
     Asp His Arg Ile Glu Ile Met Glu Glu Val Glu Lys Gly Lys Cys  
                  200                     205                 210  
     5 Tyr Lys Gln Tyr Glu Ala Ala Val Gly Arg Tyr Cys Asp Ala Ala  
                  215                     220                 225  
     Pro Ser Lys Leu Gly His Asn  
                  230

10           <210>     62  
       <211>     231  
       <212>     PRT  
       <213>     *Discosoma sp. "green"*  
       <220>  
 15           <223>     amino acid sequence of dgFP512  
       <400>     62

Met Ser Ala Leu Lys Glu Glu Met Lys Ile Asn Leu Thr Met Glu  
               5                 10                 15  
     Gly Val Val Asn Gly Leu Pro Phe Lys Ile Arg Gly Asp Gly Lys  
 20           20                 25                 30  
     Gly Lys Pro Tyr Gln Gly Ser Gln Glu Leu Thr Leu Thr Val Val  
               35                 40                 45  
     Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Met  
               50                 55                 60  
 25           Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Val Asn Tyr Pro Glu Asp Ile  
               65                 70                 75  
     Pro Asp Ile Phe Lys Gln Thr Cys Ser Gly Pro Asn Gly Gly Tyr  
               80                 85                 90  
     Ser Trp Gln Arg Thr Met Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val Cys Thr  
 30           95                 100                105  
     Ala Thr Ser Asn Ile Ser Val Val Gly Asp Thr Phe Asn Tyr Asp  
              110                115                120

( 52 )

特表2002-531146

	Ile His Phe Met Gly Ala Asn Phe Pro Leu Asp Gly Pro Val Met		
	125	130	135
	Gln Lys Arg Thr Met Lys Trp Glu Pro Ser Thr Glu Ile Met Phe		
	140	145	150
5	Glu Arg Asp Gly Met Leu Arg Gly Asp Ile Ala Met Ser Leu Leu		
	155	160	165
	Leu Lys Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Glu Thr Ile Tyr		
	170	175	180
	Lys Pro Asn Lys Val Val Lys Met Pro Asp Tyr His Phe Val Asp		
10	185	190	195
	His Cys Ile Glu Ile Thr Ser Gln Gln Asp Tyr Tyr Asn Val Val		
	200	205	210
	Glu Leu Thr Glu Val Ala Glu Ala Arg Tyr Ser Ser Leu Glu Lys		
	215	220	225
15	Ile Gly Lys Ser Lys Ala		
	230		
	<210> 63		
	<211> 235		
20	<212> PRT		
	<213> Discosoma sp. "magenta"		
	<220>		
	<223> amino acid sequence of dmPP592		
	<400> 63		
25	Met Ser Cys Ser Lys Asn Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys		
	5	10	15
	Val Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Lys		
	20	25	30
	Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Cys Ser Val Lys		
30	35	40	45

( 53 )

特表2002-531146

Leu	Met	Val	Thr	Lys	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Ile	
50							55				60				
Leu	Ser	Pro	Gln	Phe	Gln	Tyr	Gly	Ser	Lys	Val	Tyr	Val	Lys	His	
65							70				75				
5	Pro	Ala	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Lys	Lys	Leu	Ser	Phe	Pro	Gly	
	80						85				90				
Phe	Lys	Trp	Glu	Arg	Val	Met	Asn	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Val	Val	
	100						105				110				
Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Ser	Ser	Leu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Ile	Tyr	
10							115			120			125		
Glu	Val	Lys	Phe	Ile	Gly	Val	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Gly	Pro	Val	
	130						135			140					
Met	Gln	Arg	Arg	Thr	Arg	Gly	Trp	Glu	Ala	Ser	Ser	Glu	Arg	Leu	
	145						150			155					
15	Tyr	Pro	Arg	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Ile	His	Met	Ala	Leu
	160						165			170					
Arg	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	His	Tyr	Leu	Val	Glu	Phe	Lys	Ser	Ile	
	175						180			185					
Tyr	Met	Val	Lys	Lys	Pro	Ser	Val	Gln	Leu	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	
20							190			195			200		
Val	Asp	Ser	Lys	Leu	Asp	Met	Thr	Ser	His	Asn	Glu	Asp	Tyr	Thr	
	205						210			215					
Val	Val	Glu	Gln	Tyr	Glu	Lys	Thr	Gln	Gly	Arg	His	His	Pro	Phe	
	220						225			230					
25	Ile	Lys	Pro	Leu	Gln										
						235									

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、標的フラグメントを単離するために使用される3' - R A C E の改変されたストラテジーを示す。使用されたオリゴヌクレオチドの配列を表2に示す。D p 1 および D p 2 は、第1および第2のPCRにおいてそれぞれ使用された縮重プライマーである（縮重プライマーの配列については、表3および表4を参

照のこと)。

【図2】

図2 Aは、新規な蛍光タンパク質の多重アラインメントを示す。番号付けは、*Aequorea victoria*グリーン蛍光タンパク質(GFP)に基づく。*Zoanthus*由来の2つのタンパク質および*Discosoma*由来の4つのタンパク質を、互いの間で比較する：シリーズの第1のタンパク質中の残基と一致する残基と同一の残基を、ダッシュで表す。導入したギャップをドットで表す。*A. victoria* GFPの配列において、 $\beta$ シートを形成するストレッチに下線を付す；側鎖が $\beta$ -chainの内部を形成する残基に影を付ける(Yangら、*Nature Biotechnol.* 14, 1246-1251(1996)に従う)。図2 Bは、cFP484のN末端部分を示し、これは、他のタンパク質とは相同性を有さない。推定シグナルペプチドに下線を付す。

【図3】

図3は、*Anemonia majano*、amFP486由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図4】

図4は、*Clavularia*、cFP484由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図5】

図5は、*Zoanthus*、zFP506由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図6】

図6は、*Zoanthus*、zFP538由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図7】

図7は、*Discosoma striata*、dsFP483由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図8】

図8は、*Discosoma*、drFP583由来の新規な蛍光タンパク質の

( 55 )

特表2002-531146

励起および発光スペクトルを示す。

【図 9】

図9は、*Anemonia sulcata*、asFP600由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図 10】

図10は、*Discosoma dgcFP512*由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

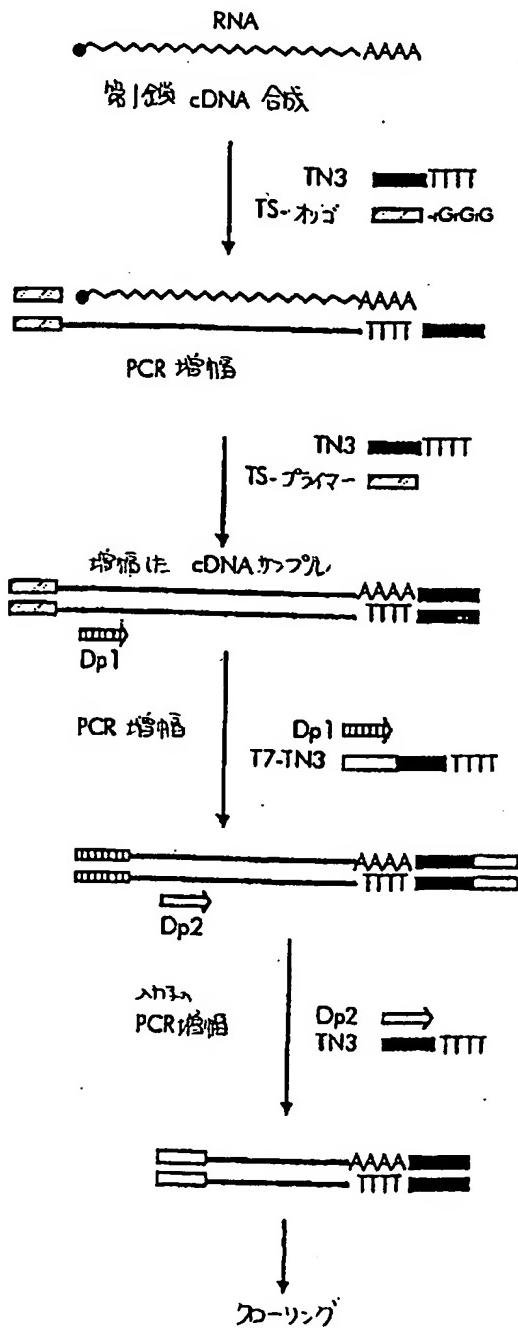
【図 11】

図11は、*Discosoma dmFP592*由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

( 56 )

特表2002-531146

[図 1]



( 57 )

特表2002-531146

## [図 2 A]

10	20	30	40	50		SEQ ID#
MSKGEELEFTG.	VVPILVELDGDNNGHKFSVSGELEGEDATYGKLT	LKFIC	TT.GKL	PVP..W	GFP	54
MAQSKHGLTK.	EHTMKYRMEGVGDGHKEVITGEIGYPFKGKQAINLCVV..	EGGPLPFAE	zFP506	57		
--H-----KE.	-----H-----N-----T-----I-----S-	-----zFP538	58			
MSWSKSVIKE.	EMLIDLHLEGTFNNGHYFEIKGKGKGPNEGNTNTLEV..	KGGPLPFGW	dsFP483	59		
...H-AL--.Y-K-N-TH--VV-JLP-K-R-D---	...YQ-SQEL-T-V-----	-----SY	dgFP512	62		
-RS--N---.F-RFKVRM--V--E--E-E-R-Y--H--K-K--.	-----A-----drFP583	60				
H-C--N---.F-REKVRM--V--E--E-E-R-Y--HCS-K-H--.	-----AF	dmFP592	63			
...MASFLKK.THPFKTTIEGTVNNGHYFKCTGKGEGNPFFEGTQEMKIEVI..	EGGPLPFAF	asFP600	61			
MAISNKFIGD.DHKMTTYIHGCVNGHYFJVKGEGNKPYEGTQTSTFKVTMANGPLAFSF	amFP486	55				
QALTTMGVIKPDMMKIKLKMEGNVNNGHAEVIEGEGEKGPKYDGHTLNLEVKAEGAPLPFSY	cFP484	56				
60	70	80	90	100	110	
PTLVTTFSYGVQCFSRYDPDHMKQHDFEKSAM..:PEGYVQERTIFFKDGGNYKTRA	EVKFEGD..	GFP				
DILSAAFNYGNRVRFTETYPQDIV..DYFKNSC..	PAGYTWDRSFLFEDGAVCICNADITVSVEEN	zFP506				
-----G-K--D-I-----G-----V-----K--	-----zFP538					
HILCPQFQYGNKAFVHHPDDIP..DYLKLSF..	PEGYTWERSMHFEDGGLCCITNDISLTGN..	dsFP483				
D--TTM----R--NY-E----IF-QTCSPNG--S-Q-T-TY--V-TA-SN--VV-D..	dgFP512					
D--S----S-VY-K-A----K----FK--V-N----VVTV-Q-S--ODG..	drFP583					
D--S----S-VY-K-A----K----FK--V-N----VVTVSQ-S--KDG..	dmFP592					
HILSTSCHYGSKTFIKVSGIP..DYFKQSF..	PEGFWERTTTYEDEGGFLTAHQDTSLDGD..	asFP600				
DILSTVFKYGNRCFTAYPTSHP..DYFKQAF..	PDGHYSWERTTYEDEGGVATASWEISLKGH..	amFP486				
DILSNAFOYGNRALTKYPODIA..DYFKQSF..	PEGYSWERTMTFEDKGIVKVKS DISMEE..	cFP484				
120	130	140	150	160	170	
<u>TLVNRIELKGIDFEDGNILGIKLEYNNYNSHNVYIMADKQKNGLIKVNFKIRHNIEUGSVQL</u>						GFP
CHYHESKEYGVNFPA	DGPVM.KM	TDNWEP	SCEKII	PVPKQGILKGDVSMYI.LI.KDGGRI.R	zFP506	
-I-K-I-N-M-----T-A-----M-----Y-	-----zFP538					
CQNYDIKFTGLNFPPNGPVV.QKKTTGHEPSTERLYP..RDGV	LIGDIHHALTVEGGGHYV	dsFP483				
T-----H-M-A---LD--MM.--R-HK----IMFE	---L-R-D-AMS-LLK----R	dgFP512				
--I-KV--I-V--SD--M---M-A-----K-E--K--KLKD--L	drFP583					
--I-EV--I-V--SD--M--RR-R--S-----K--M--RL--L	dmFP592					
CLVYKVKI	LGNNFPADGPVM.QNKAGRWEPEATEIVYE..VDGV	LQGSIMALKCPGGRHL	asFP600			
CFEHKSTFHGVNFPA	DGPVM.AKTTGHDPSFEKMTV..CDGILKGDVTAELHLOGGGNYR	SFIYEIRFDGMNFPPNGPVQ.KQKTLKHEPSTEIMYV..RDGV	amFP486			
180	190	200	210	220	230	
<u>ADHYQONTPIGDG.PVLLPDNHYLSTOSALS</u>	<u>KDPNEKRDHNVILLE</u>	<u>FVTAAGITHGMDELYK</u>	GFP			
COFDTVYKAKSV..PRKMPDWHTIQHQLTREDRSDAKQKWHLT	EHTASGSLP	zFP506				
-----S-----E-----L-----Q-----FP-----A	-----zFP538					
CDIKTVYQAKK..PVKMPGYHYVDTKLVIRSNDKEEM.KVEEHEIAVARHHPLSQ	--EE-I-KPN-	V----D--F--HYIE-T-CQNYYN V--LT-V-E--YSS-EKIGSKA	dsFP483			
VEF-SI-H----QL--Y--S--D-T-HNEDYT.I--QY-RTEG--LFL	dgFP512					
VEF-SI-HV--PS-QL--Y--S--DMT-HNEDYT V--QY-KTQ----FIKPLQ	drFP583					
CHLHTTYRSKKPASALKMPGFHFEODHRIEIMEEVEKGK.CYKOYEAAVGRYCDAAPSKLGHN	CQFHTSYKTKK..PVTMPPNHHVVERHRIARTDLDKGN.	SVQLT	asFP600			
CDFKSIYKAKK..VVKLPDYHEVDHRIEILNHDKDYN.KVTLYENAVARYSSLPSQA	FL	IP	amFP486			
			cFP484			

FIG. 2A

## [図 2 B]

MKCKFVFCLSLVLAITNANI

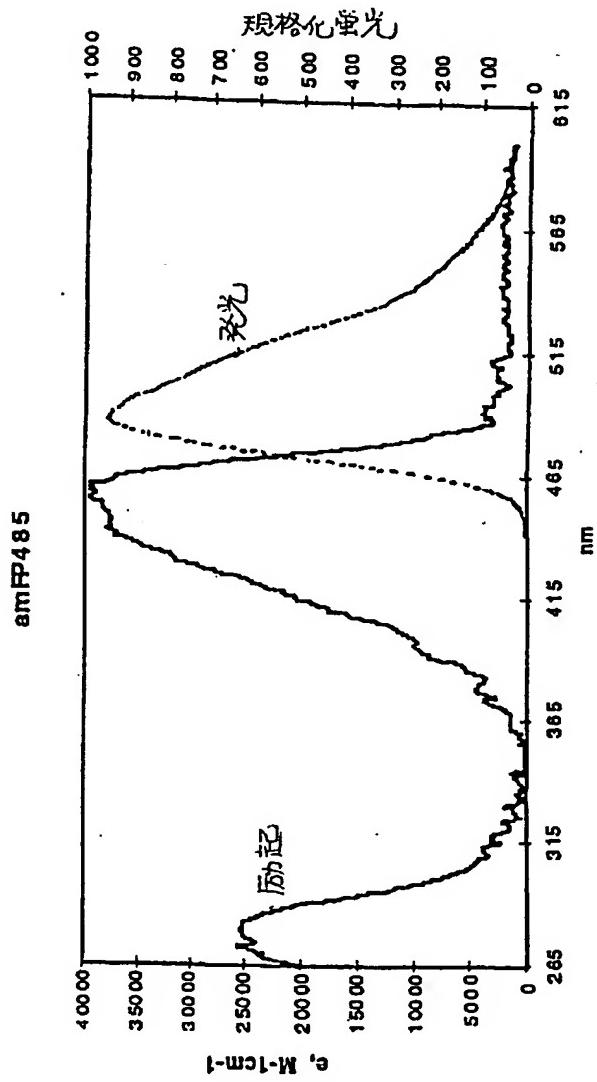


FIG. 2B

( 58 )

特表2002-531146

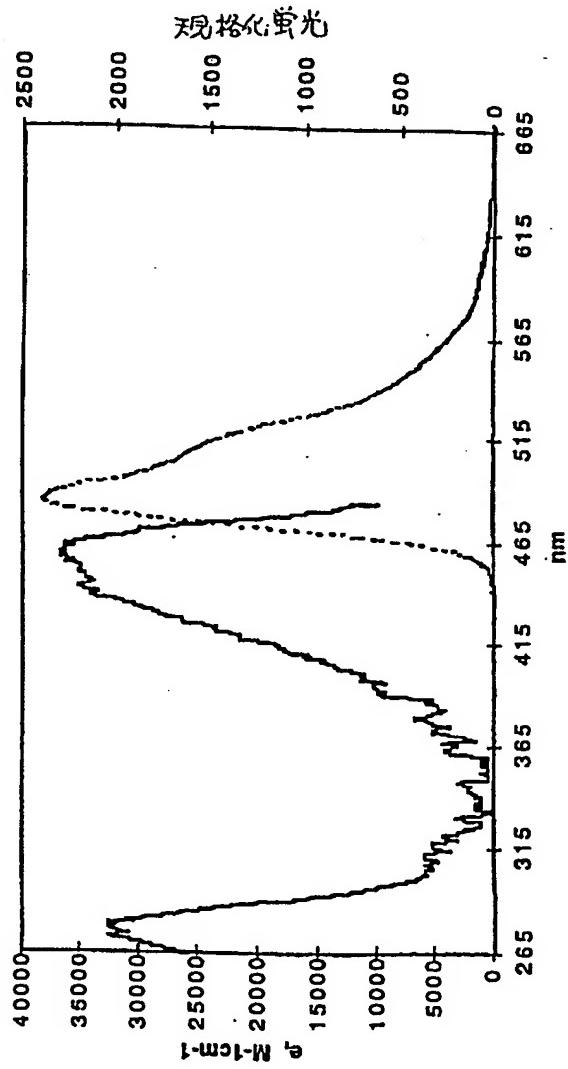
[図3]



( 59 )

特表2002-531146

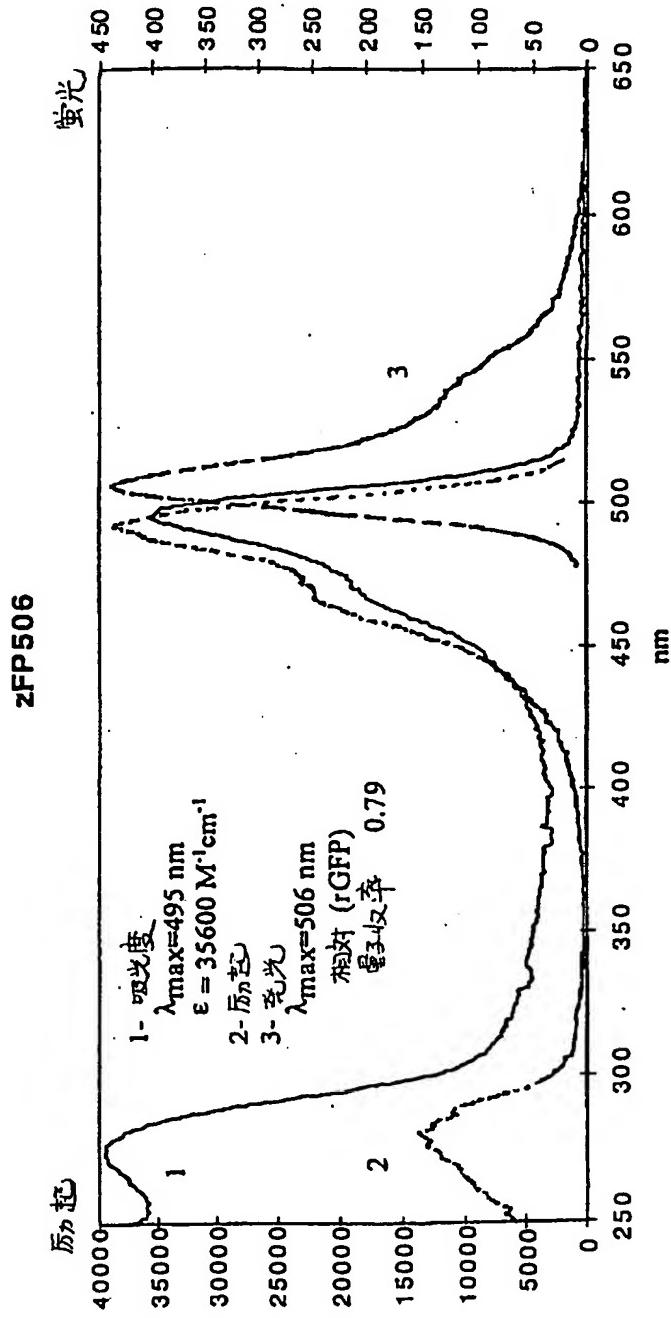
【図4】



( 60 )

特表2002-531146

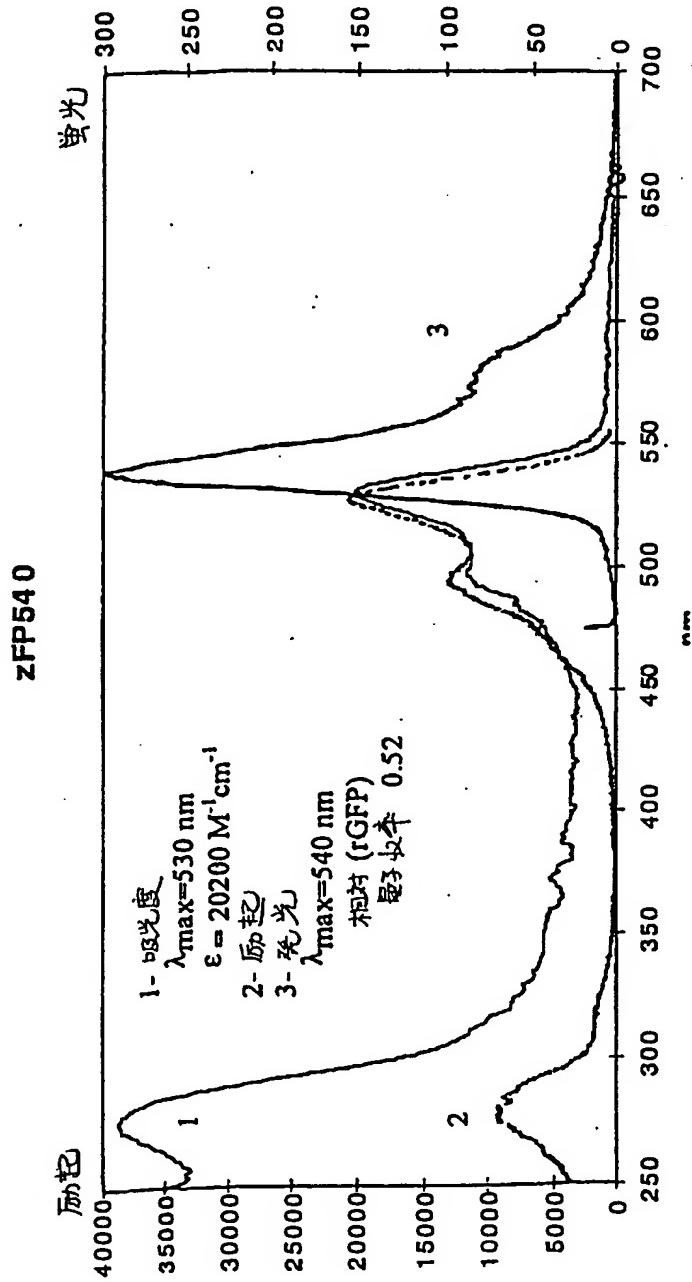
【図5】



( 61 )

特表2002-531146

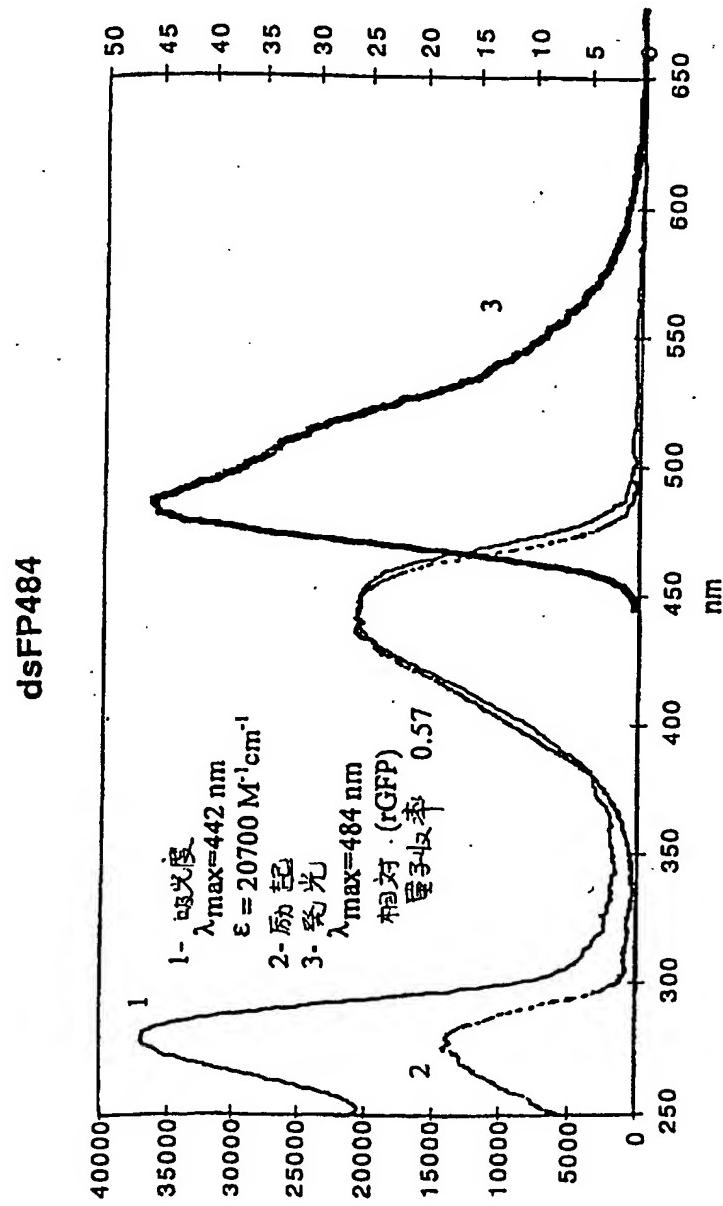
【図6】



( 62 )

特表2002-531146

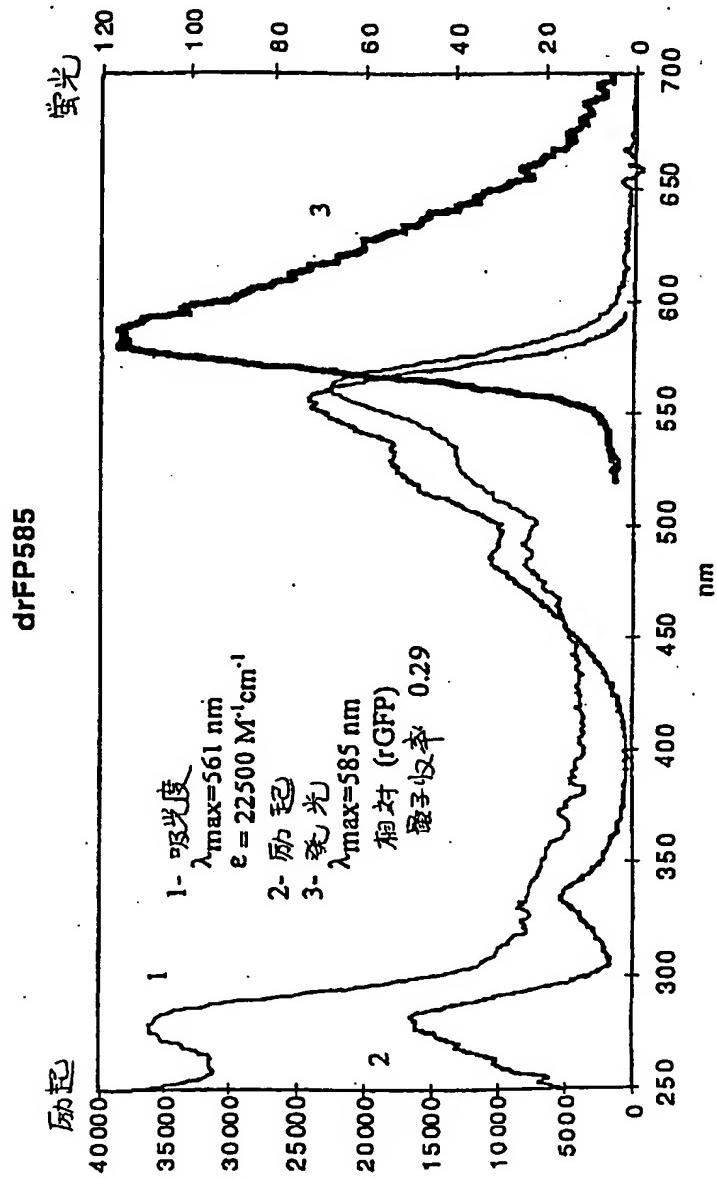
【図 7】



( 63 )

特表2002-531146

【図 8】



( 64 )

特表2002-531146

【図 9】

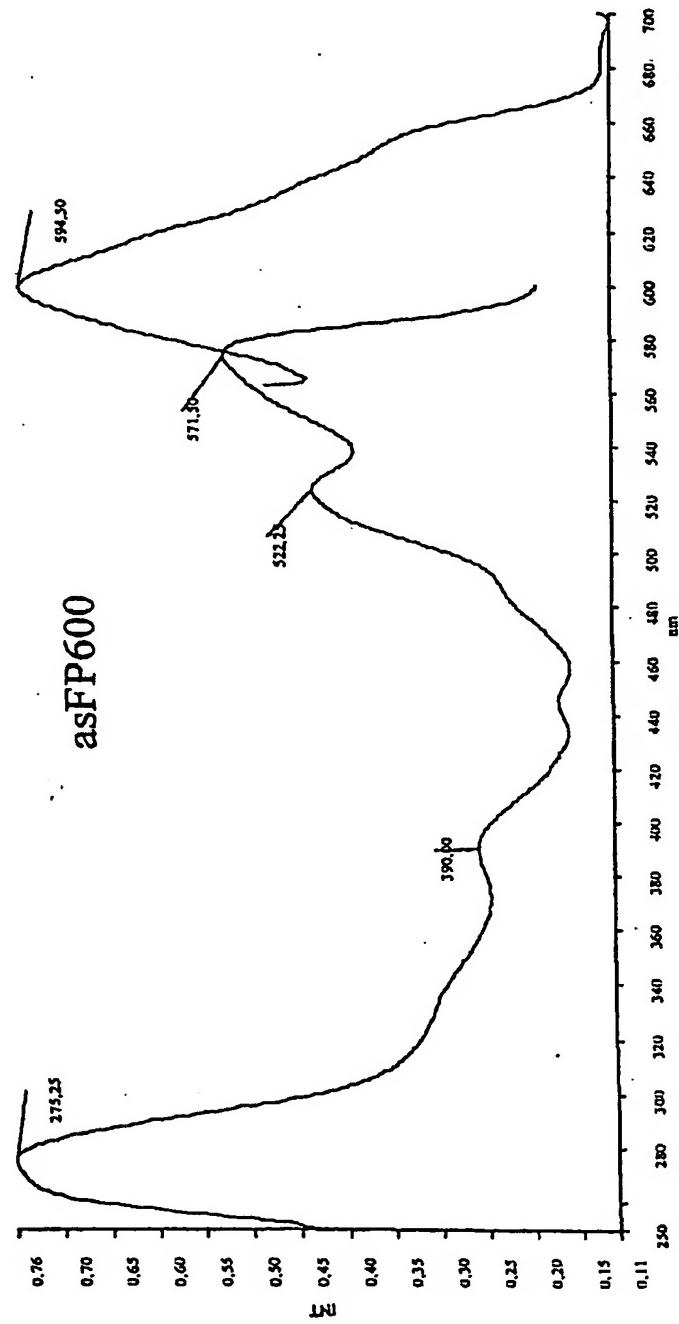


FIG. 9

( 65 )

特表2002-531146

【図10】

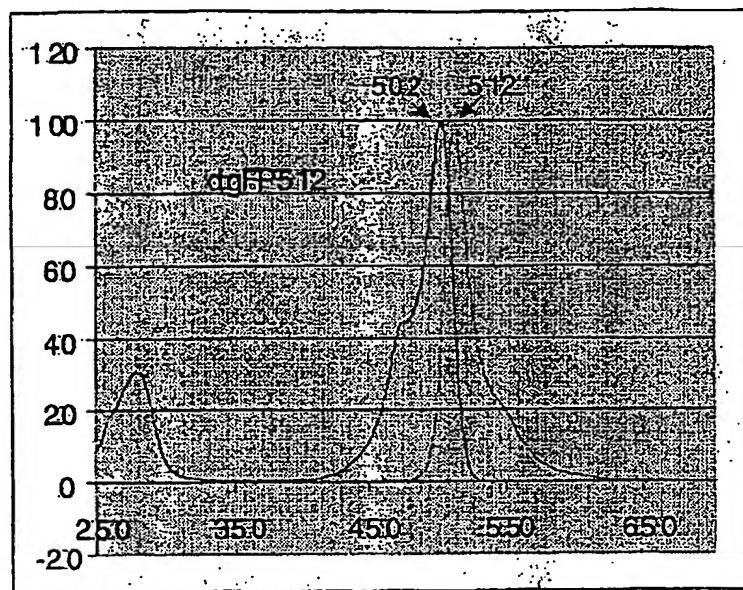


Fig. 10

( 66 )

特表2002-531146

【図11】

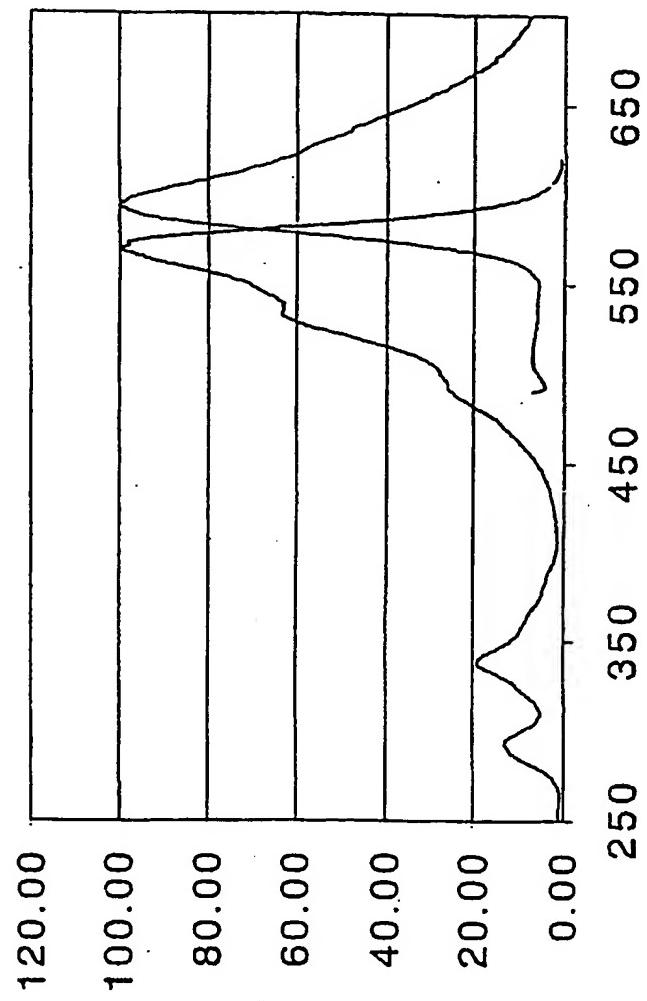
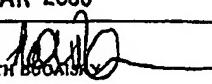


FIG. 11

( 67 )

特表2002-531146

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/29403
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) :C12Q 1/68; C07K 14/435 US CL :435/6, 69.1, 96B; 530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 69.1, 96B; 530/350; 424/9.6, 436/172		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
***	The sequence discrete submitted with the description was defective; thus the references listed below were obtained solely by a WORD search, and not by a search of the SEQ ID NOS.	***
X, P	MATZ et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nature Biotechnology. October 1999, Volume 17, No. 10, pages 969-973, entire document.	1-10
X, P	DE 197 18 640 A1 (WIEDENMANN) 22 July 1999, entire document.	3-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim(s) or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other event "E" document not published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  18 FEBRUARY 2000	Date of mailing of the international search report  02 MAR 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer  GABRIELE ELISABETH DUGAN Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

( 68 )

特表2002-531146

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テ-レコ-ド(参考)
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	15/00
C 1 2 P	21/02		5/00
		ZNAA	A

(72)発明者 フラドコフ, アルカディ フェドロビッチ

ロシア国 113570, モスクワ, 35/2  
-14, ウーリツツア ドニエプロベトロ

フスカヤ

(72)発明者 ラバス, マーリイ アレクサンドロビッチ

ロシア国 117465, モスクワ, 35-  
416, ウーリツツア ゲネララ チュレ  
ネバ

(72)発明者 マツ, ミハイル ウラディミロビッチ

ロシア国 117465, モスクワ, 712-  
28, ウーリツツア テブリイ スタン

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA04 CA20 DA06

CA11 GA19 GA27 HA03  
4B064 AG01 CA02 CA19 CC01 CC06  
CC12 CC24 CE12 DA13  
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X  
AA87X AA90Y AB01 AC14  
BA01 BA24 BB01 BC03 BC09  
BC26 BD14 CA24 CA46 CA52  
4H045 AA10 AA20 BA10 BA41 CA50  
EA50 FA74 GA26

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**